



Flor de levaduras: análisis morfológico del crecimiento en medio sólido

Gil de Prado, Elena¹; Rivas, Eva M^{a1}

Tutores: Barreiro, Pilar²; Peinado, José M.¹

¹Dpto. de Microbiología III. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid. CEI-Moncloa.

²Dpto. de Ingeniería Rural. E.T.S.I. Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid. CEI-Moncloa.
Correo electrónico: elena.gil@ucm.es

RESUMEN

La contaminación con levaduras es un factor muy relevante en el detrimento de la calidad de algunos alimentos. Cuando las levaduras se desarrollan en medio sólido lo hacen en forma de colonias superficiales. El análisis de imagen es una técnica idónea para el análisis objetivo de las diferencias morfológicas que se observan durante el crecimiento de las levaduras en medio sólido. En este trabajo se escogen los parámetros matemáticos que permitan establecer un procedimiento cuantitativo capaz de caracterizar el tránsito de una morfología circular a otra lobulada, programándolos empleando como base las librerías de análisis de imagen Matlab. El procedimiento propuesto se valida con un amplio diseño experimental: periodo de crecimiento y número de colonias por placa.

Palabras clave: Levaduras, Crecimiento colonial, Modelos cuantitativos

INTRODUCCION

El crecimiento superficial de levaduras en los alimentos sólidos, que provocan su deterioro, se realiza por medio de la formación de colonias, ya que las levaduras son células inmóviles (Wilson et al., 2002; Pipe y Grimson, 2008). La cuantificación de su crecimiento para poder elaborar modelos predictivos del riesgo de deterioro puede efectuarse mediante análisis de imagen (Rivas et al., 2012). Esta es una técnica idónea para el análisis objetivo, cuantitativo, del crecimiento y de las diferencias morfológicas que se puedan ir produciendo en las colonias a lo largo del tiempo. En este trabajo se definen nuevas características de la colonia que deben ser estudiadas y se escogen los parámetros matemáticos que permitan cuantificarlas, programándolos en un entorno de cálculo científico como es Matlab, y empleando como base las librerías de análisis de imagen que este entorno aporta. Las características escogidas han sido: 1) el área máxima que pueden alcanzar las colonias, por su proporcionalidad con el número de células que las componen, cuyo metabolismo dará origen al deterioro y 2) la complejidad de la morfología de la colonia ya que está relacionada con respuestas celulares a cambios ambientales (Vopálenská et al., 2005; Granek y Magwene, 2010). En este trabajo mostramos la validez de los parámetros escogidos para describir cuantitativamente los cambios de tamaño y morfología de las colonias de un grupo diverso de levaduras.

MATERIAL Y MÉTODOS

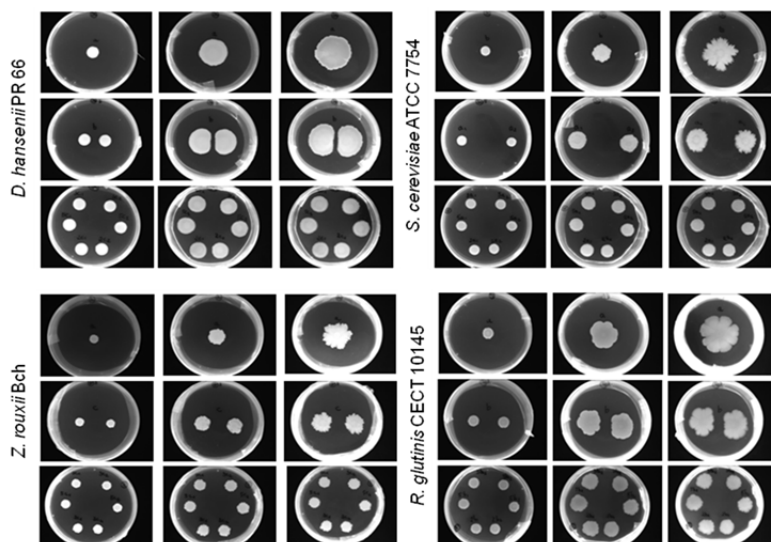
En este trabajo se han utilizado 4 cepas de levaduras pertenecientes a diferentes especies aisladas comúnmente en alimentos deteriorados: *Rodothorula glutinis* CECT 10145, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754, *Debaryomyces hansenii* PR66 y *Zygosaccharomyces rouxii* Bch. Las cepas se inocularon en matraces de 250 ml de capacidad que contenían 100 ml de medio YMB. Tras su incubación durante 18 h a 28°C con agitación (120 rpm) se diluyeron en suero salino para obtener inóculos de 10³ Unidades Formadoras de Colonias (UFC) contenidas en gotas de 10 µl que se depositaron en puntos previamente señalados de placas de Petri de 8.5 cm de diámetro que contenían 15 ml de un medio de cultivo general de levaduras, YMA (Yeast



Morphology Agar, glucosa 1%, proteosa de peptona nº3 0.5%, extracto de levadura 0.3%, extracto de malta 0.3% y agar 2%). En cada placa se inocularon de 1 a 6 colonias separadas convenientemente. Para evitar la desecación, se sellaron las placas con parafilm y posteriormente se incubaron a 28°C durante 116 días.

Durante la incubación, se realizaron de forma periódica fotografías digitales en escala de grises con el capturador y analizador de imágenes Vilber Lourmat, a las diferentes colonias pertenecientes a las cuatro especies (Imagen 1). Una regla fue utilizada para convertir la escala de píxeles a milímetros.

Imagen 1. Seguimiento temporal del crecimiento de las cuatro cepas de levaduras. Las imágenes corresponden a 4, 21 y 116 días de incubación.



Las fotografías fueron analizadas empleando unas rutinas específicamente desarrolladas al efecto, basadas en la librería de análisis de imagen de Matlab R2010a. De manera resumida, el procedimiento consiste en la segmentación automática de la imagen empleando el método Otsu (maximiza la varianza entre grupos y minimiza la varianza dentro de los grupos). Posteriormente se identifica el número de colonias en la imagen y se solicita al usuario que seleccione mediante un interfaz gráfico las colonias a caracterizar. Sobre ellas, las rutinas tipifican en primer término: área, perímetro, centro de gravedad, eje mayor, eje menor y radio equivalente. Además se calcula para todos los puntos del perímetro la distancia al centro de gravedad registrando el valor máximo y mínimo que no tiene por qué coincidir con los semiejes, tal y como se intuye en la Imagen 1. La complejidad morfológica de la colonia se establece con dos parámetros: la razón entre el perímetro real y el equivalente (diámetro del círculo con área equivalente), a la que llamamos coeficiente de circularidad y la variación relativa de los radios de la colonia, que es igual a la diferencia entre el radio mayor (RM) y el menor (Rm) dividido por el radio equivalente (Req), multiplicada por 100 para expresarla en porcentaje, a la que hemos llamado coeficiente de complejidad perimetral. El algoritmo incluye una rutina que permite cuantificar la escala del campo de visión, de manera que los valores extraídos se expresen en unidades métricas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

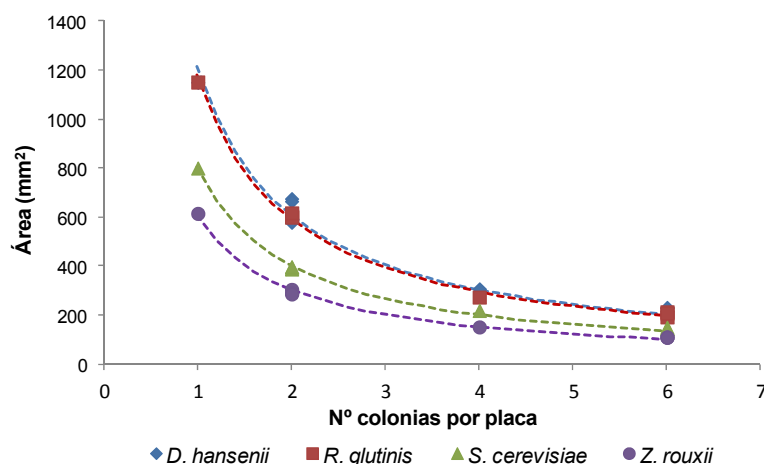
Evolución morfológica de las colonias de levaduras creciendo sobre superficies sólidas

Las colonias de levaduras creciendo sobre medios sólidos empiezan a ser visibles cuando el número de células presentes alcanza valores superiores a 10^5 ó 10^6 según las especies (Rivas et al., 2013), lo que ocurre en nuestras condiciones experimentales



(medio rico en nutrientes y actividad de agua cercana a la unidad), 24 horas después de la inoculación. Las colonias pueden crecer durante largos periodos de tiempo (meses), cambiando de aspecto hacia formas cada vez más complejas. Los primeros días son circulares, con borde liso y textura homogénea. Con el paso del tiempo los bordes se lobulan y se va perdiendo homogeneidad. Ésta parece ser una característica general de las levaduras ya que se verifica en cuatro géneros diferentes desde el punto de vista de su filogenia: capacidades metabólicas y hábitat. La Imagen 1 muestra el aspecto inicial y tras tres meses de incubación, de colonias pertenecientes a los cuatro géneros citados. Aunque se puede observar la irregularidad de los bordes y la heterogeneidad de la textura en todos los casos, es obvio que este proceso se da con una intensidad diferente en cada género.

Figura 1. Correlación entre el área máxima y el número de colonias por placa para las 4 especies de levaduras.



Relación del área final de las colonias con la cantidad de fuente de energía disponible

Las levaduras son microorganismos heterótrofos y quimiosintéticos, cuyo crecimiento está limitado por la disponibilidad del sustrato y fuente de energía, que en nuestro caso es la glucosa (S_0). Además, en un estudio previo hemos demostrado que el área de la colonia es directamente proporcional a la biomasa que la constituye: $\text{Área} = Y_{A/S} * S$ (Ec. 1) (Rivas et al., 2013). Si admitimos que la glucosa está homogéneamente distribuida en el medio, de forma que todas las colonias tienen el mismo acceso a ella, el área final de cada colonia dependerá del número de colonias (n) que haya por placa: $\text{Área}(n) = Y_{A/S} * S_0/n$ (Ec. 2). La Figura 1 confirma esta hipótesis en los cuatro géneros estudiados, es decir, en el medio sólido con 2% de agar que hemos empleado, la glucosa es igualmente accesible a todas las colonias, ya que el modelo (Ec. 2, líneas discontinuas en Figura 1) basado en esta hipótesis, muestra un excelente ajuste a los datos experimentales.

Relación entre el tamaño de la colonia y su complejidad morfológica

Como muestra la Imagen 1, en las levaduras estudiadas se puede observar un aumento en la complejidad morfológica de la colonia aunque de diferente magnitud en cada especie. Cuando medimos este aumento con lo que hemos llamado coeficiente de circularidad, que equivale al cociente entre el perímetro real, medido por el análisis de imagen y el perímetro del círculo equivalente, obtuvimos los datos que muestra la Figura 2. Según la definición del parámetro, una colonia perfectamente circular tiene un coeficiente igual a 1. Se puede medir un aumento de la complejidad que es especialmente significativo en las especies fermentativas, *S. cerevisiae* y *Z. rouxii* (Barnett et al., 1990) en el que el perímetro llega a ser más de un 50% mayor de lo que sería en una colonia circular, aspecto visualmente apreciable en la Imagen 1.



Figura 2. Coeficiente de circularidad en las especies de levaduras estudiadas en función del número de colonias por placa.

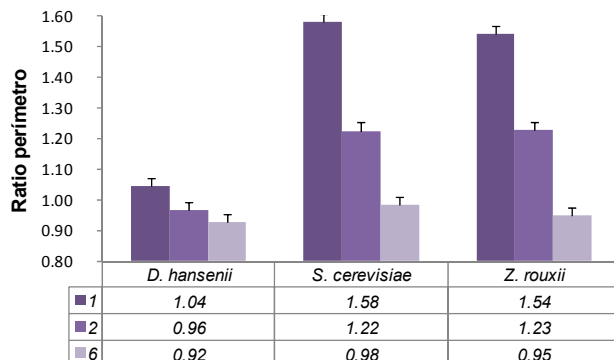
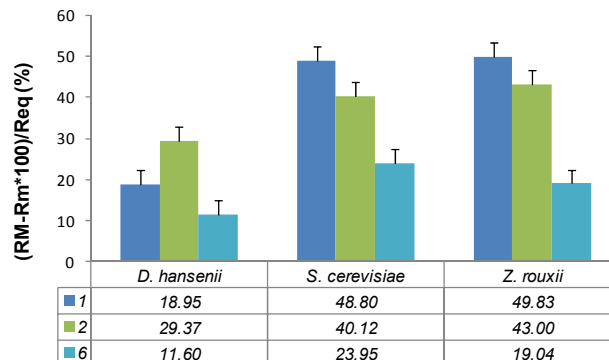


Figura 3. Coeficiente de complejidad perimetral en las especies de levaduras estudiadas en función del número de colonias por placa.



Los resultados correspondientes al coeficiente de complejidad perimetral se muestran en la Figura 3 y ofrecen un resultado ligeramente diferente al anterior. Se puede medir el aumento de la complejidad en *S. cerevisiae* y *Z. rouxii*, pero no en *D. hansenii*. En esta especie, la variabilidad relativa de los radios disminuiría al final del crecimiento, tras haber aumentado. Hay varias razones que podrían explicar este comportamiento, como la intercomunicación entre colonias vecinas que provocan formas arriñonadas (cuando hay 2, ver Imagen 1) (Palková et al., 1997; Váchová y Palková, 2011) o el crecimiento a través de grietas previas en la colonia. En cualquier caso, podemos concluir que ambos parámetros no miden exactamente lo mismo y habrá que realizar más experimentos para definir qué condiciones ambientales influyen en cada uno de ellos.

CONCLUSIONES

El análisis de imagen es una herramienta idónea para cuantificar las diferencias morfológicas en el crecimiento de colonias de levadura en medio sólido. El acceso al sustrato nutritivo tiene un efecto constatable en el nivel de desarrollo y complejidad de la colonia, siendo este último además característico para cada especie. Dada la relevancia de la morfología, en un futuro se propone el análisis de las curvas perimetrales mediante una variedad de métodos numéricos como la transformada rápida de Fourier.

AGRADECIMIENTOS

Financiado por el proyecto GR35/10A (Santander-Central Hispano-UCM) y las becas de investigación FPU del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, y PICATA del Campus de Excelencia Internacional. A María Isabel de Silóniz del grupo de Hongos y Levaduras de Interés en Agroalimentación (UCM) y a Belén Diezma del grupo LPF-Tagralia (UPM), por su colaboración.

BIBLIOGRAFÍA

- Barnett J.A., Payne R.W., Yarrow D. 1990. Cambridge Univ. Press, Cambridge
- Granek J.A., Magwene P.M. 2010. PLoS Genet., 6: doi: 10.1371/journal.pgen.1000823.
- Palková Z., Janderová B., Gabriel J., Zikánová B., Pospíšek M., Forstová J. 1997. Nature., 390: 532-536.
- Pipe L.Z., Grimson M.J. 2008. Mol BioSyst., 4: 192-198.
- Rivas E.M., Gil E., Melado A., Peinado J., Barreiro P. 2012. V Congreso de Estudiantes Universitarios de Ciencia, Tecnología e Ingeniería Agronómica. Madrid, España, pp: 153-156.
- Rivas E.M., Gil de Prado E., Wrent P., de Silóniz M.I., Barreiro P., Correa E.C., Peinado J.M. 2013. Microbiology (Enviada).
- Váchová L., Palková Z. 2011. Biochem Soc Trans., 39: 1471-1475.
- Vopálenská I., Hulková M., Janderová B., Palková, Z. 2005. Microbiology., 156: 921-931.
- Wilson P.D.G., Brocklehurst T.F., Arino S., Thuault D., Jakobsen M., Lange M., Farkas J., Wimpenny J.W.T., Van Impe J.F. 2002. Int J Food Microbiol., 73: 275-289.